

VÁLASZ

Dr. Szekanecz Zoltánnak

a Dr. Mócsai Attila MTA Doktori Értekezésére adott opponensi véleményére

Köszönöm Dr. Szekanecz Zoltánnak az értekezés alapos és gondolatébresztő bírálatát és méltató szavait. Klinikailag orientált alapkutatóként nagy öröm, de egyben nagy kihívás is Magyarország egyik vezető reumatológusának bírálatát olvasni. Kérdései a téma mély megértésére és a molekuláris biológiától a mindennapi klinikumig terjedő teljes spektrum átlátására utalnak. Konkrét kérdéseire az alábbiakban válaszolok.

Formai kifogás: Formai szempontból az egyetlen kifogásom, hogy az ábrák, és ebből következően az ábrákon szereplő feliratok sokszor túl kicsik, ami legalábbis sokdioptriás szemüvegeseknek az ábrákon való eligazodást megnehezíti. (Pl a 15., 16. ábrák kimondottan nehezen olvashatók.) A szerző nyilvánvalóan a terjedelemmel kívánt sáfárkodni, de az ábrák, legalábbis a grafikonokat tartalmazók, lehetnek volna teljes oldalszélességűek vagy egynegyed-fél oldal kiterjedésűek. (Megjegyzem, hogy a munkához csatolt 5 cikkben sem sokkal jobb a helyzet, miközben megértem hogy a sokoldalú megközelítés igénye hatalmas, több ábrából álló táblák készítését igénylik...)

Az ábrák egyes olvasók számára túl kicsi méretét sajnálom. Gyerekkorom óta rövidlátó vagyok, aminek van egy kifejezett előnye is: hogy közelre nagyon élesen látok (a laptopom is a Windows-os piacon kapható legnagyobb pixelszám/cm² értékkel rendelkezik); ezért a képek kis mérete nekem nem okozott problémát és nem tűnt fel. Egyébiránt, ahogy az ábraaláírásokban jeleztem, a dolgozat 123 ábrájából csak 8 származott külső forrásból (ezek között volt arthritis-es beteg kézfejének fényképe és osteoporosisos beteg csigolyájának postmortem elektronmikroszkópos képe is) és ebből mindössze 3 volt, melyet az ábra összetettsége miatt nem feliratoztam újra. A kritikát köszönettel elfogadva részben mégis megnyugvással tölt el, hogy a bíráló pont az utóbbi 3-ból emelt ki kettőt, mint „kimondottan nehezen olvasható” ábrákat.

1/1. Mind a négy altéma döntően a neutrophilekkel kapcsolatos. Reumatológusként is érdekelne a többi sejttípus is, hiszen pl rheumatoid arthritisben (RA) csak a folyamat kezdetén vesznek részt a neutrophilek az acut-subacut gyulladásban, később az RA egyértelműen monocyta/macrophag illetve T-sejtes betegség. Más kórképekben (pl. SLE, Sjögren syndroma, scleroderma) pedig szinte elenyésző a neutrophilek szerepe. A granulocytákra tett számos megállapítás közül, saját vagy irodalmi adatok alapján, melyek érvényesek más hemopoetikus sejtekre is?

Bár a neutrophileket tényleg nem tekintik központi jelentőségűnek az autoimmun betegségek patomechanizmusában, igen sok irodalmi adat utal arra, hogy mégis fontos szerepet játszanak ezen betegségek kialakulásában. Erről Németh Tamás kollégámmal nemrég írtunk egy összefoglalót¹, amely az Immunology Letters-ben 2012-ben publikáltak közül a legtöbbet letöltött és legtöbbet hivatkozott közlemény. A konkrét kérdéssel

kapcsolatban a dolgozatban bemutatott in vitro kísérletek legfontosabb megállapítása az, hogy a hemopoetikus sejtek sejt felszíni integrinjei a klasszikus immunreceptorokhoz (BCR, TCR, FcR) hasonló módon szignalizálnak. Mi ezt neutrofil granulocitákban vizsgáltuk legrészletesebben^{2,3}, de kevésbé részletesen makrofágokban is kimutattuk a jelenséget³. Ugyanerre utaló megfigyeléseket tettünk vérlemezkékben⁴ és oszteoklasztokban⁵ is, ami alapján következtetéseinket mások ezekben a sejtekben is megerősítették^{6,7}. További munkacsoportok később hasonló következtetésre jutottak dendritikus sejtekben⁸, mikrogliaiban⁹, NK-sejtekben¹⁰ és T-sejtekben¹¹ is. Az értekezésben leírt legfontosabb in vitro jelpálya tehát a hemopoetikus eredetű sejtek széles spektrumában működik. Az in vivo eredmények esetében nem tudjuk biztosan megállapítani, hogy azok melyik sejttípus működésének zavara miatt jönnek létre (az erre vonatkozó kísérletek folyamatban vannak).

1/2. A Módszertani részből is kiderül, hogy a chemokineknek fontos szerepe van a neutrophil migrációban és aktivációban, sőt az adhézióban is. A munkacsoport aktiválásra a MIP-2-t használja. Kérdésem, hogy miért pont ezt, hiszen egérben más, talán erősebb neutrophil kemotaktikus hatással rendelkező CXC chemokinek is vannak.

Egerekben a neutrofileket legnagyobb mértékben aktiváló CXC kemokinek a KC (CXCL1) és a MIP-2 (CXCL2), mindkettő a humán IL-8/Gro kemokinekkel rokon vegyület. A KC és a MIP-2 közül véletlenszerűen esett az utóbbira a választás, de a két kemokin között sem saját, sem mások adatai alapján nem feltételezünk lényegi funkcionális különbséget.

1/3. A módszertan és az adatok végig egzaktak, de helyenként a szerző igen őszintén de liberálisan fogalmaz („általában”, „kivételesen”, stb) ami nem mindig világos. Egy példa, hogy a 34. oldal 2. bekezdésben a K/BxN arthritis kiváltása „400 μ l, kivételesen 150 μ l szérummal” váltható ki. Ilyen esetben mit értsünk „kivételesen” alatt, illetve ha van olyan helyzet, amikor 150 μ l szérum is elég, akkor a többi esetben miért kell 400 μ l? Ezen protokollok tehát nem feltétlenül vannak kőbe vésve?

Az alkalmazott módszereket a dolgozat által felölelt bő 10 évben folyamatosan fejlesztettük és finomítottuk, emiatt azok ténylegesen nem voltak „kőbe vésve”. A részletekkel azonban nem szerettem volna terhelni az olvasót, ezért használtam az „általában” kifejezést. A K/B \times N szérum-transzfer kísérletek esetében a „kivételesen 150 μ l” konkrétan egy kísérletsorozatra, a PI3K β és PI3K δ szerepének vizsgálatára vonatkozott, melyben egyes gátló hatások 150 μ l szérummal kiváltott arthritisben kifejezett mértékűek, míg a 400 μ l-es telítő dózis esetén jóval mérsékeltebbek voltak¹² (ld. 105-107. ábra).

1/4. A LAD1 az integrinek, a LAD2 a szelektinek hiányán alapuló betegség. Jelátviteli útvonal bármely elemének deficienciája (pl Syk^{-/-}) megnyilvánul-e LAD-szerű kórképben? (Pl. a 37. oldalon a súlyos nyirokérfejlődési zavar kerül említésre.) Van-e köldökzsínör-fejlődési rendellenesség, heterozigótákban fertőzések, stb? A Syk gátlása (fostamatinib) során vannak-e hasonló jelenségek, mint a Syk-deficiens állatban?

A LAD betegségek lényege a neutrofilek migrációjának a β_2 -integrinek genetikai hiánya vagy egyéb genetikai károsodás miatti zavara, ami jellegzetes apurulens fertőzésekben nyilvánul meg (a genny kialakulásához szükséges neutrofilek nem tudnak a fertőzés helyére vándorolni). Klasszikus LAD-szerű fenotípus sem a Syk, sem a többi vizsgált fehérje hiányában nem jön létre, mivel a neutrofilek szétterülésének és aktiválódásának drámai károsodása ellenére azok migrációja lényegében normális, még akkor is, ha szigorúan β_2 -

integrin-függő körülmények között vizsgáljuk őket^{2,3,13} (ld. 7.2. fejezet). Ennek magyarázatát egyelőre sem nekünk, sem másoknak nem sikerült feltárni. A Syk^{-/-} mutánsokat mi magunk nem vizsgáltuk fertőzéses modellekben. Korábbi témavezetőm munkacsoportja ugyanakkor kimutatta, hogy a Syk neutrofil-specifikus hiánya a bakteriális fertőzések elleni védekezés kismértékű károsodásával jár¹⁴. Kollaborációban részt vettünk továbbá egy kísérletsorozatban, melynek eredményei szerint a Syk teljes hemopoetikus rendszerben való hiánya a gombafertőzések iránti érzékenység jelentős fokozódását eredményezi¹⁵ (ez esetben nem ismerjük, hogy a Syk melyik sejtvonalon való expressziója felelős a fenotípusért). Fontos megjegyezni, hogy a gombafertőzések esetén a Syk szerepe feltételezhetően független az integrinek jelátvitelétől, és inkább az egyes gombaalkotórészeket felismerő veleszületett immunreceptorok (pl. a C-típusú lektinek közé tartozó Dektin-1 és Dektin-2) jelátvitelével van kapcsolatban, amit egy összefoglaló közleményben¹⁶ részletesen is tárgyaltunk. A fostamatinib kezelés kismértékben fokozza a fertőzésekre való hajlamot¹⁷, de tudomásom szerint ez nem tartozik a vegyület legfontosabb mellékhatásai közé, és nem ismert, hogy ez a mieloid, vagy inkább a B-sejtes immunitás károsodásával (vagy egyéb nem-specifikus hatásokkal) áll-e összefüggésben.

1/5. Syk-deficienciában mely típusú integrinek működése károsodik? Csak a leukocyta integrineké ($\beta 2$) vagy a többié is?

Saját és mások eredményei alapján a vérlemezkék $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GpIIb/IIIa) integrinjeinek⁴ és az oszteoklasztok $\alpha_v\beta_3$ integrinjeinek⁷ a működése is zavart szenved. Más integrineket tudomásunk szerint megbízható módon nem vizsgáltak. A nem-hemopoetikus sejtek esetében nem várható komoly szerepe a Syk-nek, mert a Syk elsősorban hemopoetikus sejtekben expresszálódik¹⁶.

1/6. Syk-deficiencia és egyéb integrin-jelátviteli károsodás esetén milyen egyéb szövetfejlődési eltérések figyelhetők meg? Károsodik-e pl a nyirokszövetek, pl a bélfali Peyer-plakkok szerveződése (ebben pl a $\beta 7$ integrineknek alapvető szerepe van).

Ezt a kérdést sem mi, sem tudomásunk szerint senki más nem vizsgálta részletesen, melynek feltételezett oka a Syk^{-/-} egerek korai letalitása, ami nagymértékben akadályozza a kísérletek elvégzését. Balogh Péterrel (PTE Immunológiai Intézet) elkezdtük a nyirokszövetek vizsgálatát Syk^{-/-} újszülöttekben, de az eddig elvégzett egyetlen kísérlet – feltételezhetően technikai okok miatt – nem bizonyult informatívnak.

1/7. Számos neutrophil funkció nem károsodik Syk-deficiencia esetén (39. oldal). Milyen egyéb szignálmechanizmusok veszik át a Syk szerepét? Van-e kaszkád ezen mechanizmusok között? A 41. oldalon olvasható, hogy Syk^{-/-} esetén a p38 MAP kináz expressziója is károsodik. Milyen molekuláris interakció van a Syk és a p38 MAPK között? A fostamatinib vajon gátolja-e a p38 MAPK mechanizmusokat is? Mivel már klinikai kipróbálásban is vannak (voltak) p38 MAPK gátlók (pl a szerző által is vizsgált SB203580), felmerül, hogy ezen MAPK gátlása esetén hogyan változik a Syk expressziója és funkciója?

Az általunk vizsgált és Syk-től függetlennek bizonyult folyamatok nagy része Gi-fehérje-kapcsolt receptorokon keresztül jön létre. Ezekben a folyamatokban feltételezhetően a különböző PLC β -izomformák és a PI3K γ G $\beta\gamma$ -dimerek általi, illetve az Src-kinázok egyelőre nem ismert mechanizmusokon keresztüli aktivációja játssza az elsődleges szerepet (ezt egy nemrég elfogadott összefoglaló közleményben¹⁸ részletesen is tárgyaljuk). Feltételezéseink

szerint a p38 MAP-kináz Gi-fehérjék általi aktiválódásában fontos szerepet játszanak az Src-típusú tirozin-kinázok¹⁹ (ld. 81. ábra), a jelpálya további elemei viszont részleteiben nem teljesen ismertek. Az integrinek jelátvitelére esetén a p38 MAP-kináz aktiválódásának zavara véleményünk szerint leginkább az általános receptor-proximális jelátviteli zavar következményeinek egyik részjelensége. A pontos jelátvitelben feltételezhetően nagyon bonyolult jelpályák játszanak szerepet, köztük a PLC γ 2, az SLP-76, a Vav-család tagjai, a Rac és az MKK-kaszád, de még az aktin-citoszkeleton átrendeződése is. A Syk mielőid sejtekben történő aktiválódását a p38 MAP-kináz gátlása esetén nem vizsgáltuk.

1/8. Az ITAM fehérjék közül a DAP12 és FcR γ hiánya milyen klinikai fenotípust eredményez? Itt vannak-e LAD-szerű eltérések? (Később kiderül hogy egyéb alaki és csontfejlődési eltérések igen.)

A DAP12 és az FcR γ együttes hatásának vizsgálata nem könnyű, mert a kettős knockout egerek kevésbé életképesek és homozigóta formában nem szaporíthatók, ráadásul az osteopetrosis miatt beszűkült csontvelői tér másodlagos hatásokat (pl. extramedulláris hemopoézis) is kivált. Az általunk leírtakon túl egyéb látványos fenotípust nem ismerünk. Funkcionális szempontból ugyanakkor számos további receptor (pl. szelektinek, C-típusú lektinek, egyes citokin-receptorok) jelátvitelében is felmerült a DAP12 és az FcR γ szerepe. Ezekről részletesen írtunk egy összefoglaló közleményben¹⁶. Klasszikus LAD-szerű eltérésekre a neutrofilek normál migrációja³ (64. ábra) miatt nem számítottunk (erről a fenti 1/4. pontban írtam részletesen).

1/9. Mint láttuk, a chemokinek fő induktorai a neutrophil migrációnak és aktivációnak. A vizsgált szignálútvonalak és messenger fehérjék közül melyek vesznek részt a chemokin receptorok szignalizációjában? Ismeretes, hogy a chemokin receptorok pl. az integrinekkel is funkcionális kapcsolatban vannak, és a chemotaxis az adhézióval párhuzamosan zajló folyamatok. A chemokin receptorok aktiválódása esetén van-e olyan inside-out mechanizmus mely révén az integrinek expressziója és funkciója megváltozik?

Eredményeink szerint a kemokin-receptorok és egyéb Gi-kapcsolt receptorok jelátvitelére nem károsodott sem a Syk², sem a DAP12/FcR γ ³, sem a PLC γ 2¹³ hiányában (ld. 85-89. ábra). A Gi-fehérjék jelátvitelére tehát feltételezhetően más utakon történik. Ebben valószínűleg központi szerepet játszanak a G $\beta\gamma$ komplex által aktivált PLC β és PI3K γ izoformák. A kemokin-receptorok aktivációja ugyanakkor egyértelműen fokozza az integrinek „aktiválhatóságát”. Ennek a folyamatnak, az integrinekhez legközelebbi (tehát legdisztálisabb) lépéseiben feltehetően szerepe van a Rap1-nek, a talinnak és a kindlin3-nak. Mindezekről egy nemrég elfogadott összefoglalóban¹⁸ írtunk részletesebben.

1/10. Ha az alapmegfigyelés igaz, vagyis az immunreceptorok és az integrinek jelátvitelére hasonló, ez hogyan nyilvánul meg a kétféle receptor stimulációja által kiváltott válaszok egymást erősítő jellegében? A T vagy B sejt stimuláció ismeretes módon az adhéziós fehérjék fokozott expresszióját eredményezi (inside-out integrin signalling). Másrészt két leukocyta integrinek általi összetapadása aktiválja a sejteket, növeli a BCR expressziót és mediátorok felszabadulását is (outside-in signalling). Melyek az ilyen crosstalk szempontjából legfontosabb közös intracelluláris jelátviteli fehérjék?

A kérdés nagyon összetett folyamatokra vonatkozik, melyek részleteit nem értjük. Első megközelítésben azt mondhatom, hogy a hasonló jelpályák használata nem kell, hogy

különösképpen bonyolítsa a képet, hiszen feltételezéseink szerint elsősorban receptor-proximális, tehát feltételezhetően kisebb kompartmentekben történő folyamatokról van szó. Ilyen szempontból nem tartom problémának, hogy hasonlóak a kezdeti jelpályák, miközben számos más lépés (pl. kostimulációs pályák, LAT-jelátvitel, stb.) továbbra is különböző lehet. Tovább árnyalja a képet, hogy mi elsősorban mieloid sejteket vizsgáltunk, és bár T-sejtekben is felmerült hasonló integrin-jelpálya¹¹, a klasszikus antigén-receptorokat expresszáló sejtekben nem teljesen ismert a Syk vagy az azzal rokon ZAP-70 integrin-jelátvitelben betöltött szerepe. Elvileg lehetséges, hogy a hasonló jelpályák alkalmazása azt biztosítja, hogy bármelyik oldalról indul is be a sejt aktiválódása, az mindenképpen hozza létre mind az integrinek, mind az antigén-receptorok érzékenyítődését, bár erre utaló konkrét kísérleteket nagyon nehéz megtervezni és kivitelezni.

1/11. Ezzel szemben az SLP-76 arra jó példa hogy az adhézio és aktiváció szétkapcsolt folyamatok is lehetnek, hiszen az SLP hiányában az adhézio, migrációs folyamatok károsodnak, a gyulladásos mediátorok (TNF, fMLP) által kiváltott aktiváció viszont nem. Milyen klinikai fenotípust alakít ki az az SLP-hiányos neutrophil, amely, a LAD-hoz hasonlóan, nem adherál és migrál, de egyéb funkciói megtartottak? Mivel SLP hiányában a normál adhézio, migráció károsodik, de a gyulladásos mediátorok által kiváltott funkciók nem, ez jelentheti-e azt hogy az SLP a fiziológiás (homeosztatikus) adhézio folyamatokban vesz részt, a gyulladásosokban (pl arthritis) nem? Az arthritis részben (később) már nincs szó az SLP-ről. Nincs is tehát abban szerepe, vagy csak nem vizsgálták?

Összességében nem gondolom, hogy az SLP-76 hiányában (legalábbis mieloid sejtekben) lényegesen más történne, mint a Syk hiányában. Mindkét esetben károsodott adherens aktivációt és Fc-receptor-jelátvitelt, de megtartott migrációt és GPCR/citokin-receptor-jelátvitelt látunk^{2,20,21}. A Syk hiányához²² hasonlóan Gary Koretzky munkacsoportja az autoantitest-indukált arthritis súlyos károsodását tapasztalta SLP-76 hiányában²³. Utóbbi kísérletekben nem vettünk részt, ezért a dolgozatban sem tárgyaltam őket.

1/12. A p190RhoGAP-deficiens állatokban mi lehet a velőür-záródási rendellenesség mechanizmusa? Döntően a folyamat során végig szerepet játszó integrinek működészavaráról van szó?

Bár a kérdést senki sem vizsgálta részletesen, a legvalószínűbb feltételezés az, hogy a fenotípust ténylegesen az idegsejtek felszíni integrinjének a jelátviteli zavara okozza. Ezzel egybecseng, hogy a p190RhoGAP károsodása (a p190RhoGAP^{hypo/hypo} mutáció) gátolja a neuritek integrin-függő kinövését^{24,25}.

1/13. A thrombocyták integrin-függő adhéziojának vizsgálata során a Src kinázok és Syk hiánya esetén károsodott a gpIIb/IIIa integrin-dependens adhézio (szétterülés). A klinikai gyakorlatban, acut coronaria syndromában használnak anti-gpIIb/IIIa antitestet (Integrilin). Érdemes lenne az anti-integrin kezelés hatását megnézni a disszertációban szereplő jelátviteli mechanizmusokra. Src és Syk-deficiencia esetén látunk-e Glanzmann thrombastheniára jellemző fenotípust?

A vérlemezkékkel mi csak egy rövid kollaboráció erejéig kerültünk kapcsolatba, melynek során Sanford Shattil munkacsoportjával a Syk és a különböző Src-kinázok hiányában vizsgáltuk a vérlemezkék in vitro működését⁴ (ld. 48-49. ábra). A későbbiekben mi ezzel a kérdéssel nem foglalkoztunk, és az irodalomból sem ismerünk részletes, a Syk-nek

és az Src-kinázoknak az in vivo hemosztázisban betöltött szerepét vizsgáló közleményt. Ezt részben a kísérletekkel kapcsolatos technikai nehézségek (a Syk^{-/-} egerek perinatális letalitása²⁶ és az Src^{-/-} egerek súlyos osteopetrosisa²⁷, ami miatt még a fogaik sem nőnek ki és pépesített táppal kell etetni őket) is okozhatják, de lehet, hogy a vizsgálat negatív eredménnyel zárult és ezért nem került közlésre. A kérdéskört bonyolítja, hogy az integrinek mellett a vérlemezkék Fc-receptor-homológ GpVI kollagén-receptora is a Syk-en keresztül szignalizál²⁸.

1/14. Nagyon érdekes és fontos adat, hogy az FcγRIII fontos az anti-integrin antitestek aktivációs hatásához. Ennek analógja, hogy egyre több adat mutat arra, hogy pl. a terápiában alkalmazott anti-CD20 antitest rituximab hatékonysága összefügg az FcγRIII gén 158-V/F polimorfizmusával. Kérdés, hogy a FcγR génpolimorfizmusok is megváltoztathatják-e az integrinek sejtadhézióban és aktivációban kifejtett hatását?

A kérdéssel kapcsolatban fontos kiemelni, hogy az említett kísérletekben az FcγRIII csak az anti-integrin antitestek által kiváltott folyamatokban vett részt, a fiziológias integrin-ligandokon keresztüli aktiválódásban nem²⁹. Ezen konkrét kísérletek biológiai jelentősége tehát nem az, hogy az FcγRIII részt vesz az integrinek működésében, hanem az, hogy az anti-integrin antitestek által kiváltott válaszokat nem szabad kizárólag integrineken keresztüli válaszoknak tekinteni, és ezért azokból nem szabad kizárólag az integrin-jelpályára vonatkozó következtetéseket levonni (illetve értelemszerűen a korábbi ilyen következtetéseket újra kell értelmezni). Az Fc-receptoroknak az integrinek jelátvitelében való esetleges szerepét inkább az Fcγ^{-/-} mutáció hatása³ támasztaná alá, ebben az esetben azonban még egérben sem ismerjük a résztvevő Fcγ-asszociált receptort, ami nem csak Fc-receptor lehet, hanem más, azokkal rokon receptor (pl. PIR-A vagy OSCAR) is. A humán Fc-receptor-polimorfizmusok integrin-jelátvitelben betöltött szerepét mi nem vizsgáltuk, és tudomásunk szerint ilyen kísérleteket mások sem közöltek.

1/15. A főtéma neutrophil migrációs részének legfontosabb, és a szerző által is legtöbbet vitatottnak tartott, de egyértelműen alátámasztott kérdése azon dogma zseniális megdöntése, hogy az integrin adhéziónak funkciója keresztüli sejtaktiváció illetve sejt migráció teljesen más szignalizációt igényel. (Korábban valóban csak „egyféle” adhézió terjedt el a köztudatban) Kérdés, hogy a migrációban szerepet NEM játszó Syk, Src, ITAM és egyéb fehérjék helyett mely útvonalak vesznek részt a migrációban? A tofacitinibbel végzett in vitro kísérletek arra utalnak, hogy a JAK1 és/vagy JAK3 szerepet játszhat a leukocita migrációban. Vagy esetleg az ezen munkában vizsgált p38 MAPK útvonal lenne a bypass mechanizmus? Vajon a p38 MAPK és a JAK deficienciája, vagy gátlása (a szerző által is alkalmazott SB203580-cal illetve tofacitinibbel) befolyásolja-e a leukocita migrációt? Esetleg itt is a crosstalknak lehet szerepe és az integrin-közvetített migrációt végső soron más adhéziónak molekulák végzik? Számos adhéziónak molekula (pl. CD31, CD66 és mások) kolokalizációban (co-capping) helyezkedik el a β2 integrinnel. Másrészt a többlépcsős adhéziónak modell szerint míg az adhézió főleg integrin-dependens, addig a transendothelialis migrációban már más adhéziónak molekulák (pl. CD31, CD44) is szerepet játszanak. Lehetséges-e hogy amíg az adhézió-dependens aktiváció valóban főleg integrin-dependens, addig a migráció végülis ezeken keresztül megy végbe és ezáltal a szignálátviteli fehérjék is eltérőek, mint az integrin szignalizációban? Ezzel az adhézió „four-step” modelljét alapjaiban át kell még egyszer gondolni...

Ez egy nagyon bonyolult kérdéskör, amelyben sem mi, sem mások nem tudtak még érdemben előrelépni. Még maguk a β_2 -integrinek szerepe sem tisztázott. Lehetséges, hogy a különböző β_2 -integrinek közül az LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) a migrációban, míg a Mac-1 ($\alpha_M\beta_2$) az adherens sejtaktivációban játszik szerepet, és a különböző jelátvitelt a különböző α -láncok indítják be. Az is lehetséges, hogy a β_2 -integrinek jelenléte szignalizáció (pl. Syk, DAP12/FcR γ vagy PLC γ 2) nélkül is elégséges a sejt vándorláshoz, míg a β_2 -lánc CD18 törlésekor a passzív integrin-funkciók hiánya eredményezi a migráció károsodását. A további felvetések nagyon érdekesek, de részletes vizsgálatok nélkül nem mernék egy ilyen bonyolult folyamattal kapcsolatban spekulációkba bocsátkozni, többek között azért sem, mert az alkalmazott kísérleti rendszerek nagyban befolyásolják a levonható következtetéseket (arthritisben pl. a Syk^{-/-} vagy PLC γ 2^{-/-} mutánsokban sem jön létre leukocita-infiltráció^{13,22}, de ezt a gyulladásos környezet kialakulásának hiánya miatti másodlagos hatásnak tekintjük).

2/1. Hogyan történt a bokavastagság mérése? Ez a Módszertan részben röviden kerül említésre, az ábrákon mm-ben van kifejezve, tehát valószínűleg egy dimenzióban történt. Melyik tengelyen mérték a vastagságot? Esetleg két merőleges vastagságra illesztett ellipszis alapján meghatározott bokakörfogat még jobban tükrözte volna a bokavastagságot. (Mi adjuváns-indukált arthritisben ezt használtuk.)

A bokavastagságot keresztirányban, egy dimenzióban mértük speciális rugós kaliper segítségével. Kétdimenziós mérésben nem gondolkodtunk, de felmerült volumetriás mérés, amit pl. Pécssett alkalmaznak a kísérletes arthritis számszerűsítésére. De az egydimenziós mérés annyira bevált, hogy nem volt komoly motivációnk a módszer megváltoztatására.

2/2. Egyéb klinikai tünetekkel (pl. testsúly, vérkép, stb) jellemezték-e az arthritist? Az ízületi score-okon kívül ugyanis ezen modellekben jelentős testsúlyvesztés figyelhető meg, és egerből is lehet annyi vért nyerni, hogy egy kenetet készítve jellemezhezzük a sejt összetételt, aminek a gyulladás, ezen belül a neutrophilek szerepének vizsgálata során jelentősége lehet.

Testsúlyt és vérképet nem vizsgáltunk, az elmúlt időszakban viszont sokszor vizsgáltuk az ízületi infiltráció összetételét áramlási citometriás módszerekkel. Az infiltrátumban nagyon sok neutrofil és makrofágot, illetve egyéb leukocitákat találtunk. Bár a dolgozatomban tárgyalt mutációk esetében nem végeztünk részletes áramlási citometriát, a hisztológiai kép alapján feltételezhetjük, hogy az infiltráció minden eleme megszűnt a knockoutokban.

2/3. Van-e korreláció az ízületi duzzanat (vastagság) és funkció (rácson maradás) között?

Bár erre vonatkozó részletes statisztikai analízist nem végeztünk, az eddig vizsgált kísérletekben mindenhol teljes korrelációt láttunk a bokavastagság és az ízületi funkció között. Ez egyébként igaz a dolgozat benyújtása után vizsgált, részleges károsodást okozó mutációkra is, ahol a bokavastagság növekedése és az ízületi funkció károsodása hasonló mértékben csökkent.

2/4. Számomra a legizgalmasabb, megválaszolandó kérdés, hogy amíg az első főtémában egyértelműen kiderült, hogy a Syk nem játszik komoly szerepet a leukocita migrációban, addig itt a Syk kiütése a synovialis gyulladás megszűnéséhez vezetett, vagyis Syk hiányában, legalábbis ezen egérmmodellben, nincs, jelenlétében pedig van ízületi gyulladás.

Milyen olyan gyulladásos, sejtes jelenség(ek) lehet(nek) az(ok), amely(ek) egyértelműen Syk függő(ek) ezen modellben, de nem a neutrophil migrációt jelentik?

Bár közvetlen bizonyítékaink a Syk^{-/-} mutáció esetében nem nagyon vannak, feltételezzük, hogy a Syk szerepe nem a mieloid sejtek migrációjában, hanem a gyulladás helyén a neutrofilek citokin- és kemokin-termelésében van, melynek hiánya miatt nem jön létre a gyulladásos mikrokörnyezet és emiatt nem történik meg a leukociták infiltrációja sem. A Syk hiánya tehát megszakít egy pozitív visszacsatolást, melynek hiányában a gyulladás teljes folyamata károsodik.

3/1. Az ITAM fehérje (DAP12 és FcRγ)-hiányos állatokban észlelt alkati és csontfejlődési zavarok más, az ugyanezen útvonalon szereplő fehérjék (pl Syk, ZAP70) hiánya esetén is észlelhetők-e?

A ZAP-70 hiányában csontanyagcsere-zavarok nincsenek és nem is várhatók, hiszen a ZAP-70 nem expresszálódik jelentős mértékben oszteoklasztokban. A Syk^{-/-} egerek csontfenotípusának vizsgálatát az egerek korai letalitása nem teszi lehetővé, ezért nem tudjuk, hogy felnőtt korban kell-e a Syk az in vivo csontanyagcseréhez. Ennek az eldöntésére sejtvonalspecifikus géntörléses vizsgálatok szükségesek, melyeket jelenleg is folytatunk a laborban.

3/2. Az előző főtéma arthritisben számos fehérje szerepét vizsgálta, de a disszertációban arthritis vonatkozásában épp ez a két ITAM fehérje nem szerepel. A DAP12 és FcRγ hiányában létrejön-e arthritis, és vajon milyen fokú erózió (csontvesztés) lenne ez esetben a vad típusokhoz képest? Ez a kísérlet az ITAM fehérjéknek az arthritises csonterosiók kialakulásában betöltött szerepére utalna és akkor az eróziók kialakulását ITAM fehérjék blokkolása is gátolhatná.

Az arthritis vonatkozásában azért nem mutattam be a DAP12 és az FcRγ szerepét, mert mások korábban már kimutatták, hogy FcRγ^{-/-} egerekben teljesen megszűnik az autoantitest-kiváltotta ízületi gyulladás^{30,31}. Mivel ilyenkor nincs gyulladás, feltételezhetően a csonterosiók sem jönnek létre. Az FcRγ csonterosiókban való szerepének vizsgálatára ismét oszteoklaszt-specifikus géntörlésre lenne szükség. A témával kapcsolatos érdekes további megfigyelés, hogy egy másik, humán TNF-transzgén által indukált arthritis-es egérmódelben az FcRγ hiánya a gyulladás befolyásolása nélkül csökkentette a csonterosiók mértékét³².

3/3. Fostamatinib alkalmazása esetén megfigyelhetők lennének-e azon csontelváltozások amelyek a két ITAM fehérje deficienciája során?

Mivel még a Syk^{-/-} mutáció bazális csontmorfológiára kifejtett in vivo hatásáról sincs ismeretünk, ezt a kérdést jelenleg nem tudjuk megválaszolni. Ha létrejönne is csonttömegnövekedés, az feltételezhetően nagyon lassan és a fostamatinib részleges hatása miatt csak kisebb mértékben alakulna ki, mint ha a Syk-et teljesen legátolnánk vagy törölnénk.

3/4. A PLCγ2 szerepét tekintve a normális csontanyagcsere és az ovariectomia-indukált (emberben postmenopausalis?) csontvesztés eltér egymástól. A gyulladásos (arthritishez társuló) csontvesztésben milyen szerepet játszhat a PLCγ2, ha már szerepe az előző főtéma során az arthritises gyulladás kapcsán igazolódott?

A PLCγ2^{-/-} egerekben nem vizsgáltuk a csonterosiók létrejöttét arthritisben. A lényegében normális szövettani kép (102. ábra) alapján ugyanakkor feltételezzük, hogy a

gyulladásához hasonlóan a csonteróziók sem jönnek létre. A csonteróziók specifikus vizsgálatához ismételten oszteoklaszt-specifikus kondicionális géntörülésre lenne szükség.

Általános kérdés: Végül, nemcsak ezen disszertáció kapcsán, hanem minden génkiütéses vizsgálat kapcsán felmerül az az alapkérdés, hogy a génkiütés illetve az antitestes vagy más gátlószeres gátlás ugyanazon molekulák mennyire koherens eredményt ad. Egy molekula (pl Syk) deficienciája veleszületett állapot, mely, ha a deficiencia nem letális, széleskörű alkalmazkodást, több komplementer mechanizmus beindulását eredményezheti. Az egyik első eredmény volt pl. hogy az ubikviter ICAM-1 molekula teljes hiánya dacára a transzplantátum rejekció, a gyulladás zavartalanul végbemegy. Az tehát, hogy pl. a Syk hiányában egyes neutrophil funkciók megtartottak, nem biztos, hogy csak arra utalnak, hogy a Syk ebben nem játszik szerepet. Lehet, hogy a Syk jelenlétében szerepet játszik, de veleszületett hiány esetén más útvonalak helyettesítik a Syk hiányt. A Syk gátlása fostamatinibbel egészen más szituációt teremt: amikor egy eleve meglevő és működő fehérjét gátlunk. Az alapvető kérdés tehát, általánosságban és a Syk esetében is, hogy a Syk-deficiens sejtek, állatok modelljeiben nyert eredmények mennyire korrelálnak a fostamatinib kezelés során észlelt, illetve a jövőben várható hatásokkal?

A fenti kérdéskör egy, a knockout egerek alkalmazása során általában is felmerülő lehetséges problémát takar. Ezt természetesen mindig figyelembe kell venni és az eredményeket ennek megfelelően kell (óvatosan) interpretálni. Ezt én is fontosnak tartom, és ebből a szempontból egyetértek a bírálóval. Ugyanakkor a másik, gátlószeres megközelítésben ennél sokkal nagyobb problémákat és hibalehetőségeket látok. Bár a fostamatinib-et az egyszerűség kedvéért Syk-gátlószerként kezelik, már az azt kifejlesztő cég is leírta, hogy számos más kinázon és egyéb targeten is hat³³, és egy 2011-es Nature Biotechnology közlemény³⁴ szerint kb 40 olyan kináz van, melyet a fostamatinib (pontosabban annak aktív metabolitja, az R406) alacsonyabb koncentrációban gátol, mint a Syk-et (az első helyen álló Flt3-at pl. 0,71, míg a Syk-et „csak” 19 nM koncentrációban). Ezt én lényegesen nagyobb problémának látom, mint azt, hogy figyelembe kell vennünk az esetleges genetikai kompenzációs mechanizmusokat, amikor egy gén hiányának egyértelműen látható következményeit interpretáljuk.

Még egyszer köszönöm Dr. Szekanecz Zoltán alapos és gondolatébresztő bírálatát és kérem válaszaim elfogadását.

Budapest, 2013. febr. 10.



Dr. Mócsai Attila
egyetemi docens
Simmelweis Egyetem
ÁOK Élettani Intézet

Hivatkozások jegyzéke

1. Németh T and Mócsai A: The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunol Lett* 2012, **143**: 9-19.
2. Mócsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL and Lowell CA: Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 2002, **16**: 547-558.
3. Mócsai A, Abram CL, Jakus Z, Hu Y, Lanier LL and Lowell CA: Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol* 2006, **7**: 1326-1333.
4. Obergfell A, Eto K, Mócsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS, Lowell CA and Shattil SJ: Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $\alpha_{IIb}\beta_3$ initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol* 2002, **157**: 265-275.
5. Mócsai A, Humphrey MB, Van Ziffle JA, Hu Y, Burghardt A, Spusta SC, Majumdar S, Lanier LL, Lowell CA and Nakamura MC: The immunomodulatory adapter proteins DAP12 and Fc receptor γ -chain (FcR γ) regulate development of functional osteoclasts through the Syk tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**: 6158-6163.
6. Abtahian F, Bezman N, Clemens R, Sebzda E, Cheng L, Shattil SJ, Kahn ML and Koretzky GA: Evidence for the requirement of ITAM domains but not SLP-76/Gads interaction for integrin signaling in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* 2006, **26**: 6936-6949.
7. Zou W, Kitaura H, Reeve J, Long F, Tybulewicz VL, Shattil SJ, Ginsberg MH, Ross FP and Teitelbaum SL: Syk, c-Src, the $\alpha_v\beta_3$ integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *J Cell Biol* 2007, **176**: 877-888.
8. Graham DB, Stephenson LM, Lam SK, Brim K, Lee HM, Bautista J, Gilfillan S, Akilesh S, Fujikawa K and Swat W: An ITAM-signaling pathway controls cross-presentation of particulate but not soluble antigens in dendritic cells. *J Exp Med* 2007, **204**: 2889-2897.
9. Wakselman S, Bechade C, Roumier A, Bernard D, Triller A and Bessis A: Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J Neurosci* 2008, **28**: 8138-8143.
10. March ME and Long EO: β_2 integrin induces TCR ζ -Syk-phospholipase C- γ phosphorylation and paxillin-dependent granule polarization in human NK cells. *J Immunol* 2011, **186**: 2998-3005.
11. Evans R, Lellouch AC, Svensson L, McDowall A and Hogg N: The integrin LFA-1 signals through ZAP-70 to regulate expression of high-affinity LFA-1 on T lymphocytes. *Blood* 2011, **117**: 3331-3342.
12. Kulkarni S, Sitaru C, Jakus Z, Anderson KE, Damoulakis G, Davidson K, Hirose M, Juss J, Oxley D, Chessa TA, Ramadani F, Guillou H, Segonds-Pichon A, Fritsch A, Jarvis GE, Okkenhaug K, Ludwig R, Zillikens D, Mócsai A, Vanhaesebroeck B, Stephens LR and Hawkins PT: PI3K β plays a critical role in neutrophil activation by immune complexes. *Sci Signal* 2011, **4**: ra23.
13. Jakus Z, Simon E, Frommhold D, Sperandio M and Mócsai A: Critical role of phospholipase C γ 2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. *J Exp Med* 2009, **206**: 577-593.
14. Van Ziffle JA and Lowell CA: Neutrophil-specific deletion of Syk kinase results in reduced host defense to bacterial infection. *Blood* 2009, **114**: 4871-4882.
15. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschlagel N, Endres S, Hartmann G, Tardivel A, Schweighoffer E, Tybulewicz V, Mócsai A, Tschopp J and Ruland J: Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature* 2009, **459**: 433-436.
16. Mócsai A, Ruland J and Tybulewicz VL: The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol* 2010, **10**: 387-402.
17. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Musser TK, Grossbard EB and Magilavy DB: An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2010, **363**: 1303-1312.
18. Futosi K, Fodor S and Mócsai A: Intracellular signaling by neutrophil cell surface receptors. *Int Immunopharmacol* 2013, Invited review (accepted for publication).
19. Mócsai A, Jakus Z, Vántus T, Berton G, Lowell CA and Ligeti E: Kinase pathways in chemoattractant-induced degranulation of neutrophils: The role of p38 mitogen-activated protein kinase activated by Src family kinases. *J Immunol* 2000, **164**: 4321-4331.
20. Mócsai A, Zhang H, Jakus Z, Kitaura J, Kawakami T and Lowell CA: G-protein-coupled receptor signaling in Syk-deficient neutrophils and mast cells. *Blood* 2003, **101**: 4155-4163.
21. Newbrough SA, Mócsai A, Clemens RA, Wu JN, Silverman MA, Singer AL, Lowell CA and Koretzky GA: SLP-76 regulates Fc γ receptor and integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 2003, **19**: 761-769.
22. Jakus Z, Simon E, Balázs B and Mócsai A: Genetic deficiency of Syk protects mice from autoantibody-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2010, **62**: 1899-1910.

23. Lenox LE, Kambayashi T, Okumura M, Prieto C, Sauer K, Bunte RM, Jordan MS, Koretzky GA and Nichols KE: Mutation of tyrosine 145 of lymphocyte cytosolic protein 2 protects mice from anaphylaxis and arthritis. *J Allergy Clin Immunol* 2009, **124**: 1088-1098.
24. Brouns MR, Matheson SF, Hu KQ, Delalle I, Caviness VS, Silver J, Bronson RT and Settleman J: The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development* 2000, **127**: 4891-4903.
25. Brouns MR, Matheson SF and Settleman J: p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat Cell Biol* 2001, **3**: 361-367.
26. Turner M, Mee PJ, Costello PS, Williams O, Price AA, Duddy LP, Furlong MT, Geahlen RL and Tybulewicz VL: Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 1995, **378**: 298-302.
27. Soriano P, Montgomery C, Geske R and Bradley A: Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 1991, **64**: 693-702.
28. Poole A, Gibbins JM, Turner M, van Vugt MJ, van de Winkel JG, Saito T, Tybulewicz VL and Watson SP: The Fc receptor γ -chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J* 1997, **16**: 2333-2341.
29. Jakus Z, Berton G, Ligeti E, Lowell CA and Mócsai A: Responses of neutrophils to anti-integrin antibodies depends on costimulation through low affinity Fc γ Rs: Full activation requires both integrin and nonintegrin signals. *J Immunol* 2004, **173**: 2068-2077.
30. Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FM, Boackle SA, Takahashi K, Holers VM, Walport M, Gerard C, Ezekowitz A, Carroll MC, Brenner M, Weissleder R, Verbeek JS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C and Mathis D: Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity* 2002, **16**: 157-168.
31. Corr M and Crain B: The role of Fc γ R signaling in the K/BxN serum transfer model of arthritis. *J Immunol* 2002, **169**: 6604-6609.
32. Ochi S, Shinohara M, Sato K, Gober HJ, Koga T, Kodama T, Takai T, Miyasaka N and Takayanagi H: Pathological role of osteoclast costimulation in arthritis-induced bone loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**: 11394-11399.
33. Braselmann S, Taylor V, Zhao H, Wang S, Sylvain C, Baluom M, Qu K, Herlaar E, Lau A, Young C, Wong BR, Lovell S, Sun T, Park G, Argade A, Jurcevic S, Pine P, Singh R, Grossbard EB, Payan DG and Masuda ES: R406, an orally available spleen tyrosine kinase inhibitor blocks Fc receptor signaling and reduces immune complex-mediated inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, **319**: 998-1008.
34. Davis MI, Hunt JP, Herrgard S, Ciceri P, Wodicka LM, Pallares G, Hocker M, Treiber DK and Zarrinkar PP: Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* 2011, **29**: 1046-1051.